

Изобретение касается способа получения циклоспорина А, а именно относится к микробиологическому способу его получения с использованием штаммов-продуцентов.

Циклоспорин А относится к группе циклических ундекапептидов с противовоспалительными, иммуноподавляющими, антигрибковыми и антипаразитарными свойствами. Особенный интерес представляют иммуномодулирующие свойства, которые используются в трансплантационной хирургии и при лечении аутоиммунных заболеваний.

Известны многочисленные виды грибов, обладающих способностью образования циклоспорина. Наибольшая продуктивность действующего вещества может быть достигнута со штаммом грибка *Beauveria nivea*. Поэтому в промышленном получении циклоспорина А этот штамм приобретает особое значение (J. Antibiotics, V.42, 1989, p.591 - 597). Однако выход циклоспорина недостаточно велик.

Известен способ получения циклоспорина путем ферментации в полусинтетической среде с выходом 530мг циклоспорина А на литр после 16 дней культивирования, причем в качестве источника углерода используют мальтозу (Ann. N. J. Acad. Sci, 506, 1987, p.657 - 662). Этот способ также характеризуется невысоким выходом за счет потерь действующего вещества, связанных с выделением и очисткой различных циклоспоринов, в частности циклоспорина А. Эти способы выделения циклоспорина А из суспензии культур различных штаммов удовлетворяют во всех случаях ожидаемой чувствительности пептидных связей в молекуле циклоспорина А и при исключении повышенных температур осуществляются посредством экстракции "жидкость-жидкость" культуральной суспензии или экстракции отделенного влажного мицелия (Патент ФРГ №2455859). Экстракционные осадки в большинстве случаев распределяются между 30% - ным метанолом и петролейным эфиром, и обезжиренный таким образом материал многократно хроматографируют на силикагеле, оксиде алюминия и/или сефадексе 1Н20, при этом используют значительные количества адсорбента, которые до 1000 раз могут превышать количество субстрата. Высокие затраты на очистку, а также необходимость немедленной обработки маточного культурального бульона при обработке влажной грибницы представляют существенные недостатки известного способа. Недостатком известных в настоящее время способов являются также высокие затраты на растворители, в особенности на такие, которые обладают низкой совместимостью с окружающей средой.

Наиболее близким аналогом изобретения является способ получения циклоспорина А путем ферментации штамм-продуцирующего штамма в аэробных условиях в питательной среде с источниками углерода, азота, минеральных солей и микроэлементов, последующей фильтрации культуральной жидкости, экстракцией фильтрата простым эфиром карбоновой кислоты, обезжиривания петролейным эфиром и содержащим воду метанолом, выделения циклоспорина колоночной хроматографией на силикагеле или гидроокиси алюминия (ЕР №0379708, С12Н1/14, С12Р21/04, 1989). Однако указанный способ обладает недостаточно высокой продуктивностью.

Задачей настоящего изобретения являются расширение ассортимента высокопродуктивных производителей циклоспорина и создание такого экономически эффективного микробиологического способа, который основывается на использовании этих новых микроорганизмов и обеспечивает получение циклоспорина А в синтетической среде без использования комплексных азотных субстратов, а также создание технологически предпочтительного, совместимого с окружающей средой и экономически выгодного, процесса выделения и очистки циклоспорина А с хорошим выходом продукта. При этом расход вспомогательных веществ должен быть минимальным и ограничиваться веществами, совместимыми с окружающей средой.

Поставленная задача решается при использовании новых штаммов грибов *Sesquicilliosis rosariensis* G.ARNOLD F605 IMET 43887, *Sesquicilliosis rosariensis* - G.ARNOLD IMET 43888, *Tolypocladium inflatum* IMET 43899 - продуцентов циклоспорина А, а также способом получения циклоспорина А, заключающимся в ферментации продуцента в аэробных условиях в питательной среде, содержащей источники углерода, азота, минеральные соли и микроэлементы, с последующей экстракцией фильтрата, обезжириванием и выделением целевого продукта колоночной хроматографией, причем в качестве продуцента используют штамм гриба *Sesquicilliosis rosariensis* G.ARNOLD IMET 43888 или *Sesquicilliosis rosariensis* F 605 IMET 43887, или *Tolypocladium inflatum* IMET 43899, а в качестве источника азота питательная среда содержит соли аммония, в качестве источника углерода дополнительно содержит цитрат, в качестве микроэлементов дополнительно содержит двухвалентные катионы, суспензию культуры смешивают с фильтрующим средством, смесь фильтруют и сушат.

Предпочтительно для ферментации используют колонии грибка от красного до черно-коричневого цвета.

В качестве двухвалентных катионов вводят ионы Zn, Fe и/или Ca.

В качестве фильтрующего средства используют перекристаллизованный гипс, преимущественно провозит или кальцитовую муку.

Предпочтительно также перед экстракцией высушенную смесь замачивают метанолом или водным раствором аммиака.

Для экстракции в качестве простого эфира карбоновой кислоты используют этиловый эфир уксусной кислоты или сверхкритический газ, преимущественно CO₂.

Выделение целевого продукта проводят хроматографией на силикагеле или гидроокиси аммония или HPLC-хроматографией.

У оригинального микроорганизма речь идет о представителе имперфектных грибовых гиф, который выделен из пробы почвы, взятой в Сьерра дель Розарио (Куба) и которому таксономически, как новому роду и виду, Г.Арнольд присвоил обозначение *Sesquicillioipsis rosariensis* G.ARNOLD.

Организм растет на различных питательных средах, которые содержат традиционные питательные вещества для грибов. При разведении на солодовом агаре в естественном "день-ночь" ритме в течение около 10 дней возникают колонии размером до 8 см со слабо сформированным, слегка волокнистым, белым воздушным мицелием, который простирается до краев колонии. Образование кольца слабо наблюдается только на наружной части колонии. Можно установить слабый запах суповой приправы. Воздушный мицелий состоит из разветвленных гиф, которые в массе кажутся белыми. Поднимающиеся до вертикального положения конидиеносцы, как правило, в большей или меньшей степени веретенообразны или разветвлены неравномерно и несут на концах своих ветвей многие, возникшие при переходе через вершины фиалиды, бесцветные, шилообразные и гибкие. Конидии образуются на вершинах фиалид, они продолговатые, одноклеточные, фиалковые, с ровными и тонкими стенками, приклеены к маленьким головкам. Хламидоспоры не наблюдались.

От всех подобных семейств (родов) с фиалидными конидиогенными клетками (например, образующие микроконидии *Fusarien*, *Glodadium*, *Verticillium*, *Sesquicillium*, *Sympodiophora*) Г.Арнольд отличает штамм *Sesquicillioipsis rosariensis* вследствие указанных особенностей, прежде всего на основе вида и образа расположения конидиогенных клеток.

Новые микроорганизмы, которые используют в настоящем способе для получения циклоспорина, в соответствии с Будапештским договором зарегистрированы в отделении 1MET (Германия, 0 - 6900 Иена, Бойтенбергштрассе 11) под номером 1MET 43888. Точно так же проведена регистрация и высокопродуктивной линии штамма F 605, которой присвоен номер 1MET 43887.

При этом изобретение охватывает также все другие разведенные посредством мутации и/или селекции исходного штамма или вышеуказанных мутантов, варианты штаммов.

Вариант штамма Wb 6 - 5 из *Tolypocladium inflatum* выделяют посредством селекции высокопроизводительных моноспорных линий на химически определенной питательной среде, в особенности в присутствии в среде ионов кальция и цинка. Особенно поразительно выделение этого варианта штамма, если в литературе известно, что образование циклоспорина может осуществляться только в присутствии комплексных питательных веществ, таких как пептоны, или определенных аминокислот в больших количествах, которые обеспечат экономичное производство. Селектант Wb 6 - 5 штамма *Tolypocladium inflatum* зарегистрирован в отделе 1MET в Иене согласно Будапештскому договору под номером 1MET 43899.

Процесс в целом охарактеризован следующим образом.

Участки мицеллярного налета надводных культур штамма Wb 6 - 5 или же его споры суспендируют в 0,9% - ном растворе NaCl и методом агаровых слоев наносят на питательный агар, который в качестве источника углерода содержит моно- или дисахариды, а также сульфат аммония в качестве источника азота, и в течение от 14 до 21 дней культивируют при температуре от 24 до 28°C, предпочтительно при 24°C.

Выращивание штамма F 605 осуществляют аналогичным образом, но без сульфата аммония в питательном агаре. Из возникших отдельных колоний выбирают бедные воздушным мицелием экземпляры, окрашенные в красный до черно-коричневого цвета, и после переноса на углерод-минерально-солевой агар применяют для получения ареалов мицеллярного налета размерами от 2 до 4 см. Эти ареалы в виде участков агара переносят на первый погруженный пассаж предварительного разведения, который культивируют в колбе Эрленмейера емкостью 100 мл или 500 мл, у которой 20% объема составляет среда для разведения.

Питательный раствор содержит глюкозу, мальтозу или сахарозу в качестве источника углерода, кроме того, органические или неорганические субстраты азота, а также минеральные соли, и после инфицирования в течение от 48 до 96 ч культивируется при температуре от 24 до 28°C при встряхивании на ротационном

вибраторе с числом оборотов от 100 до 240 об/мин. После вызревания первой культуры в культуре на жидкой среде (соответствует первой предварительной культуре) осуществляют в данном случае инфицирование второй культуры (соответствует второй предварительной культуре) с инокулятом от 5 до 10% объема питательного раствора вторичной культуры. Эта ступень состоит либо из 500 мл колбы Эрленмейера, которая содержит 100 мл вышеуказанной среды, или из малогабаритного ферментатора с устройством для перемешивания и продувки и нетто-объемом от 5 до 25 л с обычным техническим оснащением для поддержания температуры и проветривания. После 48- до 96 - часового культивирования среда с главной культурой, которая в качестве единственного источника азота содержит соли аммония, инфицируется в количестве от 5 до 10% объема предварительной культурой и культивируется в течение от 5 до 20 дней при перемешивании и продувке или же с помощью ротационного встряхивания. При этих условиях достигается производительность ферментационных композиций до 3000 мг циклоспорина на литр, который аналитически обрабатывается известным образом посредством HPLC. Культуральные суспензии ко времени созревания и сбора имеют красную до черно-коричневой окраску.

Циклоспорин А выделяют из культуральных суспензий следующим образом: культуральные суспензии смешивают с вспомогательным фильтрующим материалом и затем фильтруют, влажную биомассу сушат; полученную таким образом смесь сырой биомассы и вспомогательного фильтрующего материала экстрагируют простым эфиром карбоновой кислоты или альтернативно сверхкритическим газом, предпочтительно CO₂; экстракт обезжиривают посредством распределения между содержащим воду метанолом и петролевым эфиром, и предварительно очищенный таким образом экстракт хроматографируют на силикагеле и/или оксиде алюминия.

Преимущества данного способа выделения заключаются, прежде всего, в следующем:

- отделение без потерь биомассы благодаря незначительному размеру частиц, образование способного к высыханию материала, который является стабильным, стойким при хранении и способным к экстрагированию;
- экстракционный способ с незначительной долей балластных веществ и пониженными затратами на очистку;
- приспособление дальнейших этапов очистки к специальным свойствам применяемых продуцентов;
- уменьшение использования экстракционных средств.

Однако биомасса применяемого продуцента выпадает не как обычно и предпочтительно в форме гиф, а в корпускулярной форме с размерами частиц 10 - 30 мкм и образует плохо фильтрующийся и тяжело отделяющийся осадок на фильтре. В соответствии с изобретением эту сложность преодолевают благодаря тому, что культуральную суспензию непосредственно или же после предварительного концентрирования с помощью центрифугирования смешивают со вспомогательным фильтрующим средством, обладающим хорошим разделительным эффектом (например, перекристаллизованный гипс-прекозит, кальцитовая мука), и непосредственно вслед за этим фильтруют. Весовое отношение вспомогательное фильтрующее средство/сухая биомасса = (1 - 4) : 1 обеспечивает хорошую фильтрующую способность, быстрое высушивание и эффективное отделение осадка после экстракции.

Полученная таким образом сырая биомасса, которая еще содержит от 35 до 60 вес.% культурального фильтрата, несмотря на ее пептидную природу дает поразительным образом возможность практически без потери вещества посредством конвекционной сушки (например, в вакуумном сушильном шкафу, сушильном шкафу с циркуляцией воздуха, в сушилке с кипящим слоем или ленточной сушилке) при температуре до 80°C, предпочтительно при 40 - 60°C, перевести ее в препарат сухого мицелия, у которого целесообразно оставить соотношение влажной массы и твердого вещества (0,02 - 0,15) : 1. Альтернатива заключается в лиофилизации, которая точно также обеспечивает стабильный и экстрагируемый сухой продукт.

Для последующей двойной и тройной экстракции рекомендуется предпочтительно этиловый эфир уксусной кислоты, который увлекает за собой значительно меньше балластных веществ, чем, например, этанол или ацетон. Это особенно важно, если количество процессов экстракции ограничивается двумя.

Остаток, остающийся после выпаривания, частично обезжиривают известным способом посредством распределения между метанолом, содержащим воду, или этанолом и петролевым эфиром, и содержит уже до 40 вес.% вещества. Целесообразно осуществить увлажнение мицелия перед экстракцией аммиачной водой. При обработке тяжело экстрагируемых типов мицелия рекомендуют мицелий с 20 до 40 вес.%, предпочтительно с 25 вес.%, оставить для предварительного набухания свыше 8 до 72 часов и первую экстракцию провести с ультратурраксом (Ultra-Turax).

Альтернативно к "твердо-жидкой" экстракции с органическими растворителями действующее вещество может экстрагироваться также из сухого мицелля сверхкритическими газами, предпочтительно CO_2 . Давление и температура при этом являются специфическими для газа. Для CO_2 оказывается наиболее целесообразном область приблизительно от 100 до 300 бар и температуры от 35 до 60°C. Целесообразно поддерживать экстракцию посредством добавления средства для вытяжки, например от 0,5 до 1,5 вес.% этанола по отношению к CO_2 . Загрязнения, прежде всего жиры, отделяют с помощью многоступенчатой экстракции или же фракционированного отделения.

Первую очистку на хроматографической колонке осуществляют по выбору на нейтральном оксиде алюминия (50 - 100 - кратное количество) или силикагеле (30 - 60 - кратное количество) с этиловым эфиром уксусной кислоты в качестве подвижной фазы, вторую очистку проводят всегда на силикагеле (преимущественно 40 - кратное количество) в этилацетате.

Как логическое продолжение сверхкритической экстракции в порядке альтернативы жидкостной хроматографии при нормальном давлении возможно проведение последующей селекции действующего вещества с помощью HPLC-хроматографии.

Пример 1. Кусочки мицелиального налета культуры с поверхности штамма *Tolypocladium inflatum* Wb 6 - 5 переносят прежде всего на глюкозо-минерально-солевой агар, который имеет следующий состав, г/л: глюкоза 20; NH_4SO_4 5; KH_2PO_4 2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; CaCO_3 3,4; агар 20; значение pH от 5,3 до 5,7; стерилизация в течение 30 мин при 120°C. После инкубации чашек Петри при 24°C в течение 14 - 21 дня из возникающих ареалов выбирают окрашенные в красные и черно-коричневый цвета. Засевание (прививка) первой погруженной культуры осуществляют посредством переноса кусочка налета размером около 1 см на 100 мл культуральной среды следующего состава, г/л: глюкоза 50; казеинпептон 10; KH_2PO_4 1; KCl 2,5; дистиллированная вода до 1 л; значение pH от 5,3 до 5,6; стерилизация в течение 30 мин при 120°C. Колбы с культурой емкостью 500 мл культивируют в течение 72 ч при температуре от 24 до 25°C на ротационном "встряхивателе" с числом оборотов от 180 до 220 об/мин, в качестве критерия зрелости (созревания) культура показывает коричнево-черное окрашивание и в количестве 5% служит как затравочный материал главной культуральной среды, которая помещается в 500 мл колбы Эрленмейера, в каждую по 100 мл, и имеет следующий состав, г/л: глюкоза 80; NH_4SO_4 5; NH_4HPO_4 2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,008; CaCO_3 5,1; дистиллированная вода до 1 л; значение pH от 5,3 до 5,9; стерилизация в течение 30 мин при 120°C. Культивирование осуществляется в течение 11 дней при температуре от 24 до 25°C на ротационном вибраторе со скоростью 180 об/мин.

После окончания ферментации бульон культуры смешивается с метанолом в соотношении 5 : 1 (v/v), и для определения ценности применяется экстракция. Она осуществляется известным образом - посредством наполнения HPLC-колонок. Производительность такого типа ферментационной установки составляет 1100 мг циклоспорины А на литр.

Пример 2. Из надводной культуры штамма *Sesquicillioipsis rosariensis* F605 на агаре солодового экстракта (20 г солодового экстракта/л) после по крайней мере 14 - дневного культивирования (инкубации) при 24°C, получается суспензия спор, которая служит для засеивания первичной культуры (пред-культуры). Среда первичной культуры имеет следующий состав, г/л: мальтоза или глюкоза 75; казеинпептон 25; KH_2PO_4 1; KCl 2,5; деионизированная вода до 1 л; значение pH 5,5; стерилизация в течение 30 мин при 120°C. 100 мл среды первичной культуры засеиваются 2×10^7 спор и в 500 мл - колбе Эрленмейера инкубируются (термостатируются) при 24°C в течение 72 ч на ротационном вибраторе с частотой 190 об/мин. Непосредственно после этого осуществляется перенос культуры в среду главной культуры в соотношении 1 : 10, которая имеет следующий состав, г/л: глюкоза 100; гидроцитрат диаммония 15; KH_2PO_4 1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 2,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,003; деионизированная вода до 1 л; значение pH 5,5; стерилизация в течение 60 мин при 110°C. Все условия культуры выбираются в соответствии с первичной культурой. Установленное на 11 - й день культивирования содержание циклоспорины А составляет максимально 1150 мг/л культуральной суспензии. Определение действующего вещества осуществляется, как описано в примере 1.

Пример 3. Выращивание и культивирование штамма *Sesquicillioipsis* A84/195/-3/ проводят по аналогии с примером 2. При указанных условиях на 11 - й день культивирования в суспензии культуры определяют содержание циклоспорины А, составляющее 150 мг/л. Анализ содержания активного вещества в суспензии культуры проводят аналогично примеру 1.

Пример 4. Из культуры Эмере *Sesquicillioipsis rosariensis* варианта штамма F 605, культура которого "индуцировалась" на глюкозо-минеральном агаре следующего состава, г/л: глюкоза 20; кислый цитрат диаммония 5; NH_2PO_4 1; MgSO_4

$\times 7\text{H}_2\text{O}$ 2,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,003; CaCO_3 0,5, - через, по меньшей мере, 21 день культивирования при 24°C получают суспензию спор, которую используют для прививки форкультуры. Дальнейшее культивирование проводят по аналогии с примером 2.

Пример 5. Разведение и культивирование штамма F605 осуществляют в первичной культуре, как описано в примере 2, однако в противоположность тому, штамм-продуцент после первичной культуры переводят в 5л лабораторный ферментер, который содержит уже представленную в примере 2 среду главной культуры и вращается (перемешивается) со скоростью от 200 до 500 мин, а также продувается (вентируется) с объемным током от 0,25 до $1,0\text{л} \times \text{мин}^{-1} \times \text{л}^{-1}$. Продолжающаяся вплоть до 14 дней ферментация дает выход циклоспорина А максимально 3150 мг/л.

Пример 6. После выполненного согласно примеру 2 разведения затравочного материала для штамма F605 ферментер-мешалка, содержащий жидкую питательную среду следующего состава, г/л: глюкоза 50; соевый шрот 2,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4,1; KH_2PO_4 5,0; значение pH 5,5; стерилизация в течение 60 мин при 110°C, - засеивают средой с 2×10^8 спор/л среды, температура, перемешивание и вентиляция соответствуют характеристикам, приведенным в примере 3 для главной культуры. Полученная таким образом через 4 дня культура служит в качестве 10% - ного инокулята для производственной ступени в 450л ферментере из легированной стали, который содержит указанную в примере 2 жидкую питательную среду главной культуры, и культивируется при поддержании условий, названных выше для первичной культуры.

В результате ферментации, проведенной по указанному типу, после 14 дней культивирования образуется в среднем 2г циклоспорина А на литр культуральной суспензии.

Пример 7. 6л культуральной суспензии штамма F605 вида *Sesquicillioipsis rosariensis* G.ARNOLD (IMET 43887) пропускают через ручную фильтровальную пластину, на которую нанесен слой прекозита (PRECOSIT), и полученный таким образом сырой продукт высушивают в камерной сушилке с циркуляцией воздуха в течение 6 часов при температуре 50°C.

Получают 246г смеси - высушенный мицелий-прекозит, которая содержит приблизительно 50вес.% прекозита.

Смесь предварительно замачивают с 60мл 10% - ного водного раствора аммиака в течение 15 мин и трижды перемешивают с (в совокупности) 4,2л этилового эфира уксусной кислоты, в трех порциях, каждое перемешивание - 30 мин. Отфильтрованный от твердого вещества экстракт после отгонки растворителя дает 21г осадка, количество которого сокращается до 14г после того, как его вносят в 100мл этанола, содержащего 5% воды, трижды встряхивают с 300мл (каждый раз) петролейного эфира и выпаривают метанол.

Очистка методом колоночной хроматографии на 1000г оксида алюминия нейтрального, степень активности 1, в этиловом эфире уксусной кислоты дает после приблизительно 500мл первой (головной) фракции 1450мл главной фракции, после повторной хроматографии остатка на силикагеле 60 Мерк (0,063 - 0,2мм) в том же растворителе и перемешивания с 7 - кратным количеством н-гексана получают 5,2г почти белого продукта с 99вес.% циклоспорина А по HPLC.

Пример 8. 327,5л культуральной суспензии названного в примере 5 мутанта с содержанием биосухого вещества 21,1% смешивают с 13,1кг прекозита и фильтруют в 2 порциях на напорном фильтре с поверхностью фильтра 0,5м (центробежный дисковый фильтр, модель E1T). Поверхность фильтра предварительно покрывают прекозитом (намывание) в количестве 250г на порцию. Сырой осадок на фильтре (вес 28,5кг) высушивают в сушилке с вихревым (кипящим) слоем при температуре приточного воздуха от 35 до 55°C, так что образуется смесь сухой мицелий-прекозит весом 15,4кг. Полученную сухую массу прежде всего перемешивают в нутче-мешалке со 100л, а затем с 70л этилового эфира уксусной кислоты, каждое перемешивание - по 30 мин. Осветленный и первично очищенный экстракт концентрируют вначале в вакуумном циркуляционном выпарном аппарате, затем - в вакуумном ротационном испарителе до маслянистого осадка, который вносят в 8л метанола. После добавления 0,4л воды смесь трижды взбалтывают с 16л (каждый раз) петролейного эфира. Отделенная метанольная фаза после упаривания в вакуумном ротационном испарителе дает 600г осадка.

Первичная очистка методом колоночной хроматографии на 24кг силикагеля 60 Мерк в этиловом эфире уксусной кислоты дает 275г 79% - ного (вес. 7%) сырого циклоспорина. Повторную хроматографию проводят на 14кг силикагеля 60 Мерк в метилхлориде с долей метанола 2,5вес.%.

Пример 9. Вакуумный ячеистый фильтр с поверхностью фильтра 0,3м покрывают 10кг прекозита в качестве первичного намывания. Затем фильтруют 290л культуральной суспензии описанного в примере 5 мутанта. К культуральной суспензии перед этим добавляют еще 60г/л прекозита. Получают 62,5кг сырого

остатка на фильтре, содержащего 55,4вес.% воды. 50кг этой сырой массы высушивают в вихревом (кипящем) слое и дают 22,5кг смеси сухой мицелий-прекозит с содержанием действующего вещества 6,3г/кг.

Пример 10. 20кг полученной согласно примеру 7 смеси сухой мицелий-прекозит замачивают с 5л метанола и выдерживают в течение 24ч при комнатной температуре в закрытом сосуде.

После этого материал вносят в 50л этилацетата и экстрагируют (взбалтывают) 40мин с ультратурраксом. После отделения остаток с фильтра в течение 10мин перемешивают со следующими 50л этилацетата и отсасывают. Остаток объединенных экстрактов обрабатывают аналогично тому, как это описано в примере 6, и получают 61,5г чистого циклоспорина А.

Пример 11. 0,52кг полученной согласно примеру 7 смеси сухой мицелий-прекозит (TMP) экстрагируют с 5,2 - 6,5кг/ч сверхкритического CO₂ при давлении 300бар и температуре 40°C при добавлении от 50 до 80мл этанола в течение 6ч. При этом экстрагируют около 60% содержащегося в смеси (TMP) циклоспорина А. Полученный таким образом экстракт подвергают дальнейшей обработке до чистого вещества аналогично тому, как это описано в примере 6.